

Informe final publicable de proyecto

En búsqueda de tratamientos efectivos y seguros para enfermedades parasitarias desatendidas: Chagas y Leishmaniasis Visceral.

Código de proyecto ANII: FCE_3_2022_1_172684

Fecha de cierre de proyecto: 01/10/2025

AGUILERA LÓPEZ, Elena Paola (Responsable Técnico - Científico)

VEIRA, María Claudia (Investigador)

YALUFF, Gloria (Investigador)

BENÍTEZ BONÉ, Diego Raúl (Investigador)

DÁVILA SARALEGUI, Belén Lourdes (Investigador)

MALDONADO, Alice (Investigador)

PEREZ DIAZ, Leticia (Investigador)

PORTILLO, Nilda (Investigador)

RAMOS GRANJA, Rachel (Investigador)

SERNA GRANCE, María Elva (Investigador)

TERRA, Pilar (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\ UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN \\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

Las enfermedades de Chagas y Leishmaniasis afectan a millones de personas en América Latina y en el mundo. Los tratamientos disponibles son antiguos, costosos y muchas veces generan efectos adversos importantes, lo que hace urgente la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

Este proyecto se centró en el “reposicionamiento de fármacos”. En lugar de diseñar medicamentos desde cero, se evaluaron medicamentos ya aprobados y disponibles en nuestro país para otras enfermedades, explorando si podían también combatir a los parásitos responsables de estas dolencias. También, dada la larga trayectoria realizada por nuestro grupo de investigación en estas enfermedades, combinamos la estrategia de “reposicionamiento de fármacos” con moléculas con destacada actividad *in vitro* e *in vivo* de origen sintético (arilidenonas) que tiene nuestro grupo.

Se estudiaron más de 100 medicamentos de uso común y se identificaron varios con actividad prometedora contra los parásitos que causan la Leishmaniasis y la enfermedad de Chagas. Algunos, como naftazona, bromuro de pinaverio, formononetina (climodin), gabapentina para *T. cruzi* y metamilzol, carvedilol, desloratadina para leishmaniasis mostraron resultados alentadores tanto en pruebas de laboratorio como en modelos animales. Además, se analizaron combinaciones de medicamentos entre sí o medicamentos y moléculas sintéticas, encontrando pares que actuaron de forma aditiva o sinérgica, lo cual abre nuevas posibilidades para tratamientos más eficaces y menos tóxicos.

Los resultados confirman que el reposicionamiento de fármacos es una vía accesible y realista para generar nuevas terapias contra enfermedades desatendidas. Estos avances no solo aportan conocimiento científico, sino que también sientan bases para futuros ensayos preclínicos y clínicos, con impacto potencial en la salud pública de nuestra región.

Ciencias Médicas y de la Salud / Ciencias de la Salud / Medicina Tropical / I+D de fármacos

Palabras clave: Chagas / Leishmaniasis / sinergismo /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Antecedentes

La enfermedad de Chagas y las Leishmaniasis viscerales (LV) son enfermedades parasitarias desatendidas con gran relevancia en América Latina y otras regiones tropicales y subtropicales. La enfermedad de Chagas es causada por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y, desde su descubrimiento hace más de 100 años por el Dr. Chagas, se considera potencialmente mortal, con aproximadamente 12.000 muertes anuales. Se estima que entre 6 y 7 millones de personas en el mundo están infectadas por *T. cruzi*, principalmente en áreas rurales de Latinoamérica [1]. Es endémica en 21 países y su propagación se ha visto favorecida por la globalización y la migración de individuos infectados [2]. La morbi-mortalidad de la enfermedad supera a otras infecciones parasitarias, incluida la malaria [3]. La transmisión ocurre principalmente por la vía vectorial, a través de heces u orina de insectos triatomíneos, conocidos como vinchucas, que pican a seres humanos y otros mamíferos. En Uruguay, aunque se erradicó *Triatoma infestans* en 1997 mediante control integrado de vectores [4], se estima que entre 8 y 10 mil personas permanecen infectadas y muchas sin diagnóstico debido al desconocimiento de la población y del personal de salud.

La Leishmaniasis visceral es causada por protozoarios hemoflagelados del género *Leishmania*: *L. donovani*, predominante en el subcontinente indio, China, África e Irak; *L. infantum*, común en la cuenca del Mediterráneo europeo y africano; y *L. chagasi*, responsable de los casos en América [5]. La enfermedad se caracteriza clínicamente por fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y adenopatías [6]. Sin tratamiento, la LV tiene una tasa de mortalidad superior al 95 %. La mayoría de los casos reportados se concentran en Brasil, el este de África e India.

En Uruguay, la LV representa una amenaza emergente: en 2010 se detectó por primera vez el vector *Lutzomyia longipalpis* en Arenitas Blancas, activando alertas epidemiológicas. En febrero de 2015 y agosto de 2016 se identificaron los primeros casos en perros en Salto y Bella Unión, llevando a la eutanasia de cerca de 60 caninos como medida preventiva. En diciembre de 2018 se diagnosticó el primer caso humano, una niña de 4 años en Salto, que luego de un tratamiento largo y costoso evolucionó favorablemente [7]. El segundo caso, en enero de 2019, involucró a una mujer de 33 años con comorbilidades, que falleció 20 días después del diagnóstico [8]. Hasta la fecha, se han registrado 9 casos humanos en Salto [9].

Los principales fármacos utilizados para LV incluyen antimoniales pentavalentes, anfotericina B y miltefosina [10,11], con eficacia variable según región, edad y estado inmunológico del paciente. Otros agentes, como paromomicina [12,13] y pentamidina [14,15], tienen uso limitado en América Latina debido a alto costo, resistencia farmacológica y variabilidad en eficacia. La coinfección LV-VIH representa un desafío adicional, aumentando hasta 100 veces el riesgo de desarrollar LV sintomática y quintuplicando la mortalidad [16,17]. La detección de reservorios asintomáticos en humanos y animales complica aún más el control de la enfermedad [18].

Los tratamientos actuales para Chagas, como Benznidazol y Nifurtimox, aunque efectivos en fases agudas, presentan limitada eficacia en etapas crónicas, mutagenicidad, efectos adversos severos y alto costo [19]. La escasa disponibilidad de nuevos fármacos refleja el desinterés de la industria farmacéutica debido a la baja rentabilidad, afectando principalmente a poblaciones de bajos recursos [20].

El reposicionamiento de fármacos surge como estrategia efectiva para enfermedades desatendidas como Chagas y LV [21-24]. Este método permite reutilizar medicamentos aprobados para otras patologías (como antimoniales pentavalentes para *Trypanosoma* spp., anfotericina B para hongos y miltefosina como anticancerígeno) acelerando estudios clínicos y reduciendo riesgos y costos, al aprovechar información previa de farmacocinética, toxicología y vías metabólicas [25-27]. Además, esta estrategia disminuye la necesidad de experimentación animal y permite aplicaciones veterinarias.

Nuestro grupo de investigación, desde 1994, ha trabajado en el diseño racional de moléculas con actividad antiparasitaria frente a *T. cruzi* y *Leishmania* spp. Se han identificado compuestos relevantes, incluyendo tiazolidenhidrazinas y diarilidencetonas, con excelente actividad parasitaria y perfiles farmacológicos prometedores. Además, se han desarrollado moléculas esteroideas con resultados superiores a los fármacos comerciales. Recientemente, se exploraron

combinaciones con fármacos comerciales en modelos preclínicos de Chagas, obteniendo resultados alentadores. Con base en estos antecedentes, el proyecto propone investigar la combinación de estos compuestos con otros fármacos utilizados en Uruguay que tengan acción tripanosomicida o leishmanicida, buscando alternativas terapéuticas eficaces, seguras y accesibles.

Problema de investigación

A pesar de los avances en control vectorial y disponibilidad de fármacos históricos, existen limitadas opciones terapéuticas efectivas y seguras para Chagas y LV. Los tratamientos actuales presentan baja eficacia en fases crónicas, resistencia farmacológica, efectos adversos severos, costos elevados y escasa disponibilidad. La coinfección LV-VIH, la asintomaticidad de los reservorios humanos y animales, y la vulnerabilidad de países como Uruguay frente a vectores y reservorios incrementan la complejidad del control sanitario.

La industria farmacéutica demuestra desinterés por estas enfermedades debido a la baja rentabilidad, dejando a poblaciones vulnerables sin acceso a terapias modernas. Esto hace indispensable explorar estrategias innovadoras que permitan el desarrollo rápido de fármacos eficaces, seguros y de bajo costo, incluyendo reposicionamiento de medicamentos y combinaciones sinérgicas de agentes bioactivos.

Objetivos

Objetivo general:

Identificar y evaluar fármacos y moléculas sintéticas con actividad tripanosomicida y leishmanicida, así como posibles combinaciones sinérgicas o aditivas, con el fin de desarrollar terapias más seguras, eficaces y accesibles para Chagas y Leishmaniasis visceral.

Objetivos específicos:

Seleccionar medicamentos aprobados y moléculas sintéticas del grupo de trabajo para su evaluación frente a *T. cruzi* y *L. infantum*.

Evaluar la actividad antiparasitaria de estos compuestos *in vitro* e *in vivo*.

Identificar combinaciones que potencien la acción tripanosomicida o leishmanicida mediante efectos sinérgicos o aditivos.

Analizar la toxicidad y perfil farmacológico de los compuestos más prometedores.

Justificación

El desarrollo de tratamientos eficaces, seguros y de bajo costo es crucial para Chagas y LV, especialmente en regiones vulnerables de América Latina. El reposicionamiento de fármacos y la combinación de agentes bioactivos permite acelerar el desarrollo terapéutico, minimizar riesgos y costos, y reducir la experimentación animal.

Los antecedentes del grupo de investigación muestran que existen moléculas sintéticas con alta actividad antiparasitaria y baja toxicidad, constituyendo una base sólida para avanzar hacia estrategias terapéuticas más efectivas [28,30-36]. Este proyecto tiene el potencial de generar alternativas terapéuticas innovadoras, mejorar la calidad de vida de los pacientes y contribuir significativamente a la salud pública nacional e internacional.

Metodología/Diseño del estudio

Compuestos y preparación de principios activos

Se utilizaron medicamentos aprobados para uso clínico en Uruguay, tanto en formulaciones sólidas como líquidas, con el objetivo de evaluar su potencial de reposicionamiento como agentes antitripanosomátidos. En el caso de las formulaciones sólidas (comprimidos o cápsulas), los principios activos fueron extraídos mediante trituración manual en mortero y posterior tratamiento con solventes orgánicos seleccionados según la solubilidad del compuesto (principalmente acetato de etilo, diclorometano o acetona). Las suspensiones resultantes fueron filtradas para remover excipientes insolubles y el solvente fue eliminado por evaporación a presión reducida. Las formulaciones líquidas (jarabes o soluciones) fueron utilizadas sin extracción previa, ajustando las concentraciones en función de la molaridad estimada del principio activo declarado por el fabricante. Para verificar la pureza e identidad de los compuestos más activos y selectivos se procedió a emplear técnicas de cromatografía y resonancia magnética nuclear.

Previo a su empleo en los bioensayos, todos los compuestos fueron solubilizados en dimetilsulfóxido (DMSO, grado biológico) para obtener soluciones madre de 25 mM o 50 mM, que fueron almacenadas a -20 °C en alícuotas para evitar ciclos de congelamiento-descongelamiento. Durante los ensayos, la concentración final de DMSO en los sistemas biológicos no superó el 1 %, nivel en el cual no se observaron efectos adversos sobre parásitos ni células hospedadoras.

2.2. Cultivo y mantenimiento de parásitos

2.2.1. *Trypanosoma cruzi*

Se emplearon diferentes estadios evolutivos de *Trypanosoma cruzi*:

Epimastigotes [28]: Cepa Tulahuen 2 (DTU TcVI), cultivados a 28 °C en medio Brain Heart Infusion (BHI) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (penicilina/estreptomicina 100 U/mL).

Tripomastigotes tisulares [36]: Cepa CL Brener (DTU TcVI), obtenidos a partir de ratones BALB/c infectados durante la fase aguda de parasitemia, para su uso en infecciones experimentales *in vivo*.

Tripomastigotes metacíclicos e intracelulares: Cepa Dm28 clon (DTU TcI), derivada de cultivos de epimastigotes de 15 días, utilizada para infectar células Vero. Los tripomastigotes liberados al sobrenadante tras 5–7 días de incubación a 37 °C y 5 % CO₂ fueron recolectados por centrifugación (3000×g, 10 min) y utilizados inmediatamente o refrigerados por corto plazo.

Amastigotes intracelulares [36]: Obtenidos a partir de células Vero previamente infectadas (relación infección 10:1), fijadas y teñidas con DAPI para cuantificación microscópica.

2.2.2. Leishmania spp.

Se emplearon dos especies:

Leishmania infantum MHOM MA6717/MAP263 (promastigotes y amastigotes): La forma promastigote se cultiva en BHI y la forma amastigote en RPMI, 10% de SFB [37].

También se empleó una línea bioluminiscente que expresa la luciferasa *Photinus pyralis* (PpyRE9H o RE9HLUC) [29].

Utilizada para ensayos in vitro: estudios de viabilidad, citometría y combinaciones farmacológicas.

Leishmania amazonensis, cepa: IFLA/BR/1967/PH8. Utilizada en el modelo murino in vivo de leishmaniasis cutánea. Mantenido por pasajes cada 6–8 semanas en hámsteres (*Mesocricetus auratus*).

2.3. Ensayos in vitro contra *T. cruzi*

2.3.1. Ensayo de inhibición en epimastigotes [28]

Suspensiones de epimastigotes de *T. cruzi* Tulahuen 2 fueron ajustadas a una concentración inicial de 4 × 10⁶ parásitos/mL y distribuidas en placas de 24 pocillos (0,6 mL por pocillo). Los compuestos se añadieron a una concentración inicial de 25 µM (o 100 µg/mL en el caso de extractos naturales). Tras 5 días de incubación a 28 °C, la proliferación se determinó por densidad óptica a 610 nm, calculando el porcentaje de inhibición respecto al control negativo tratado con 0,4 % DMSO.

Los compuestos con inhibición superior al 65 % fueron considerados activos y se les determinó la concentración a la cual inhibe el 50% del crecimiento (CI₅₀) mediante regresión no lineal ajustada a una curva sigmoidea de Boltzmann.

2.3.2. Ensayos en tripomastigotes [37]

Los tripomastigotes de *T. cruzi* Dm28 fueron expuestos a concentraciones crecientes de los compuestos durante 24 h en placas negras de 96 pocillos (densidad de 1 × 10⁷ parásitos/pocillo). La viabilidad se midió mediante resazurina (2 mg/mL en RPMI), registrando la fluorescencia (Ex 530 nm / Em 590 nm) tras 4 h de incubación a 37 °C.

2.3.3. Ensayos en amastigotes intracelulares [37]

Se infectaron células Vero con tripomastigotes Dm28 (relación 10:1) y, una vez establecida la infección, se trataron con los compuestos a diferentes concentraciones durante 24 h. Tras el tratamiento, las células fueron fijadas y teñidas con DAPI, y se cuantificó el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por célula.

2.4. Ensayos in vitro contra *Leishmania* spp.

2.4.1. Screening en promastigotes [38]

Se evaluó la actividad leishmanicida inicial en promastigotes de *Leishmania infantum* cultivados en BHI suplementado con 10 % de suero fetal bovino. Las formas promastigotes se ajustaron a 4 × 10⁶ parásitos/mL y se incubaron con los compuestos a 100 µM durante 5 días a 28 °C. La viabilidad se determinó mediante la medida de absorbancia a 610nm al día 0 y día 5 siguiendo con la siguiente formula para calcular el porcentaje de inhibición: $(Ap - Ap0)/(Ac5 - Ac0) \times 100$, donde Ap es la absorbancia del compuesto al día 5; Ap0 es la absorbancia al día 0 del compuesto; Ac5 es la absorbancia al día 5 del control negativo y Ac0 es la absorbancia al día 0 del control negativo.

2.4.2. Ensayo bioluminiscente en amastigotes intracelulares de *Leishmania infantum* en THP-1 [29]

La actividad frente a la forma amastigote intracelular de *L. infantum* se evaluó empleando macrófagos humanos derivados de la línea THP-1 infectados con parásitos que expresan luciferasa, mediante un ensayo bioluminiscente.

Las células THP-1 se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 10 % SFB y se sembraron en placas de 96 pozos. La diferenciación a macrófagos se indujo con PMA (50 ng/mL, 48 h), seguida de un periodo de reposo de 24 h en medio sin PMA. Posteriormente, los macrófagos se infectaron con promastigotes de *L. infantum* luciferasa+ (MOI 10:1) durante 4–6 h a 37 °C, tras lo cual se realizaron lavados con PBS para eliminar los parásitos extracelulares y se incubó 24–48 h adicionales para permitir la diferenciación a amastigotes intracelulares.

Los cultivos infectados se trataron con distintas concentraciones de los compuestos en estudio durante 48–72 h, incluyendo controles de crecimiento (vehículo), control positivo (fármaco de referencia). Al finalizar el tratamiento, se añadió el reactivo de luciferasa según las indicaciones del fabricante y se midió la bioluminiscencia en un lector de placas. La viabilidad parasitaria se expresó como porcentaje respecto al control de crecimiento y los valores de CI₅₀ se obtuvieron mediante ajuste no lineal de las curvas concentración–respuesta.

2.5. Ensayos de combinación binaria e isoblografía [28]

Las combinaciones de dos agentes activos se evaluaron mediante el método isoblográfico. Para cada par, se prepararon mezclas a fracciones fijas de sus CI50 individuales: 0,25×CI50 + 0,25×CI50; 0,5×CI50 + 0,5×CI50; 0,75×CI50 + 0,75×CI50; y 1×CI50 + 1×CI50. Tras 5 días de incubación con epimastigotes de *T. cruzi* ó promastigote de *Leishmania Infantum*, se calculó el porcentaje de inhibición y se determinó la concentración combinada que generó un 50 % de inhibición (CV).

Se calculó el índice de la concentración inhibitoria fraccional o FIC (Fractional Inhibitory Concentration):

$$FIC = (CI50 \text{ en combinación} / CI50 \text{ individual}) + (CI50 \text{ en combinación} / CI50 \text{ individual})$$

Los valores de FIC se interpretaron como menores a 1, sinergismo, iguales a 1, aditividad y mayores a 1, antagonismo.

2.6. Estudios de mecanismo de acción in vitro de *T. cruzi* y *L. infantum* [37]

Para analizar si los mecanismos de acción descritos en mamíferos se mantenían en *T. cruzi*, se repitieron los ensayos de CI50 en epimastigotes Tulahuen 2 y promastigote de *L. infantum* en presencia de:

Exceso de Ca²⁺ (1 mM de CaCl)

Exceso de L-glutamato (1 mM)

Exceso de N-acetil-L-cisteína (NAC) (1 mM)

Además, se realizaron estudios de mecanismo de muerte en parásitos expuestos a 20×IC50 mediante citometría de flujo, utilizando marcadores de apoptosis temprana y tardía (Annexina V / yoduro de propidio o CA-AM/IP), clasificando las poblaciones en viables, apoptosis temprana, apoptosis tardía/necrosis o necrosis. Se estudió a las 6 h y 24 h para ver el efecto de muerte.

2.7. Modelo in vivo agudo de Chagas en ratón BALB/c y Leishmaniasis cutánea [29, 30]

2.7.1. Aprobación ética y condiciones de alojamiento

Modelo murino agudo de Chagas.

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética en Experimentación Animal de Paraguay. Se utilizaron ratones BALB/c machos de 3 meses de edad, alojados en cajas individuales bajo condiciones controladas de temperatura (22–24 °C) y ciclo luz-oscuridad 12:12 h, con alimento y agua ad libitum. La parasitemia se monitoreó cada 2–3 días mediante recuento directo en cámaras de Neubauer con sangre obtenida de la cola, expresando los resultados como número de parásitos por mililitro de sangre. El tratamiento farmacológico se inició cuando la parasitemia alcanzó su pico máximo (entre los 5 y 7 días postinfección).

Los fármacos evaluados incluyeron compuestos previamente identificados como activos in vitro. La eficacia terapéutica se determinó mediante la reducción de la parasitemia en sangre periférica y la supervivencia de los animales hasta 30 días post-infección.

Al finalizar el tratamiento, se consideró la tasa de supresión parasitaria y la curación parasitológica, evaluadas por xenodiagnóstico y hemocultivo. Los resultados fueron expresados como media ± desviación estándar (DE), y el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba de Tukey, considerando diferencias significativas para $p < 0.05$.

Modelo murino de leishmaniasis cutánea

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética en Experimentación Animal de Paraguay. Para los estudios in vivo, se empleó un modelo murino de leishmaniasis cutánea utilizando ratones BALB/c (machos y hembras), suministrados por el IFFA-CREDO (Lyon, Francia) y criados en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), San Lorenzo, Paraguay.

Los parásitos empleados fueron amastigotes de *Leishmania amazonensis* (cepa IFLA/BR/1967/PH8), mantenidos mediante pasajes sucesivos cada 6–8 semanas en hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*), que sirvieron como reservorio biológico para conservar su virulencia.

La infección experimental se realizó mediante la inoculación en la almohadilla plantar posterior derecha de los ratones con 2×10^6 amastigotes suspendidos en 100 µL de solución salina fosfatada (PBS).

El seguimiento de la enfermedad se efectuó semanalmente durante 7 a 12 semanas, registrando el diámetro de la lesión cutánea con calibre digital.

Los tratamientos se iniciaron 1 a 2 semanas después de la inoculación, cuando la infección ya estaba bien establecida y las lesiones visibles.

Tras dos semanas del fin del tratamiento, los animales fueron sacrificados y se evaluó la carga parasitaria en el tejido lesionado.

Las lesiones se pesaron, homogenizaron y cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % SFB, glutamina, penicilina y estreptomicina, incubándose a 27 °C durante 7 días. El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 8, aplicando ANOVA y prueba t de Student, considerando diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

2.7.2. Regímenes de tratamiento

Los compuestos se administraron por vía oral mediante cánula intragástrica a animales conscientes, una vez al día durante 15 días consecutivos. Las dosis se expresaron en µmoles/kg de peso corporal, ajustándose, cuando fue posible, al equivalente molar de benznidazol (50 mg/kg=192 µmoles/kg). Las combinaciones binarias se administraron con cada componente a dosis completas o a la máxima dosis factible según su solubilidad o toxicidad.

2.7.3. Determinación de parasitemia

Se empleó el micrométodo capilar. Se colectaron muestras de sangre por punción en cola en capilares calibrados (8–18 mm), que fueron centrifugados a 3000×g durante 40 s. Se cortó el capilar en la interfase entre eritrocitos y suero, extendiéndose el contenido sobre portaobjetos. Se contaron los tripomastigotes móviles en 50 campos a 40×, promediando el número de parásitos por campo y expresándolo como tripomastigotes/5 mm³.

2.7.4. Seguimiento de supervivencia

Se registraron los días de mortalidad y se construyeron curvas de supervivencia Kaplan–Meier por tratamiento.

2.7.5. Determinación de anticuerpos anti-T. cruzi

Al final del ensayo (día 64), se recolectaron 200 µL de sangre de la vena caudal en ratones no anestesiados. Se realizó un ELISA utilizando antígenos derivados del lisado de epimastigotes (T. cruzi cepa Y, DTU TcII). Se determinaron los niveles de IgG anti-T. cruzi mediante densidad óptica a 450 nm.

2.8. Modelo in vivo de leishmaniasis cutánea [30]

Ratones fueron infectados subcutáneamente en la base de la cola con promastigotes de Leishmania braziliensis. El tratamiento se administró por vía oral o subcutánea según el compuesto, durante 14 días. La evolución de la lesión se midió con calibre digital semanalmente. Al finalizar el experimento, se cuantificaron los parásitos residuales en piel mediante cultivo o qPCR (según disponibilidad).

2.9. Ensayo en modelo Danio rerio (zebrafish) para el estudio del desarrollo embrionario [30]

Para la evaluación de los posibles efectos teratogénicos y embriotóxicos de los compuestos seleccionados, se utilizó el modelo embrionario de Danio rerio (D. rerio), reconocido por su alta sensibilidad a contaminantes y fármacos, y por la conservación de rutas de desarrollo homólogas a las de mamíferos.

Los embriones de D. rerio fueron obtenidos mediante cruce controlado de adultos sanos, mantenidos en sistemas acuáticos con temperatura controlada (28 ± 1 °C), pH 7.0–7.5 y ciclo luz/oscuridad de 14/10 h. Los huevos fecundados se recolectaron dentro de las primeras 2 h post-fertilización (hpf) y se seleccionaron bajo microscopio estereoscópico, descartando aquellos con irregularidades morfológicas o sin segmentación normal.

Los embriones viables se distribuyeron en placas de 24 pozos, con 10 embriones por pozo, sumergidos en 2 mL de medio E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, pH 7.2). Se utilizaron dos controles negativos: 1% DMSO (vehículo) y agua de acuario (sin solvente). El control positivo empleado fue cafeína a su LD₉₀ embrionaria = 2.4 mM, previo antecedente de uso en el grupo como control de ensayo. Estos controles permitieron validar la sensibilidad del experimento y la observación de fenotipos esperados.

La exposición se realizó durante las primeras 96 horas post-fertilización (hpf), con renovación diaria del medio y de las soluciones de los compuestos. Se registraron los siguientes parámetros:

Tasa de eclosión (hpf 48–72)

Mortalidad embrionaria (%)

Malformaciones morfológicas (edema pericárdico, deformación de columna, curvatura caudal, microcefalia)

Longitud total del embrión (hpf 96)

Frecuencia cardíaca (lat/min)

Los embriones se observaron bajo un microscopio estereoscópico Leica M205C y las imágenes se analizaron con el software FIJI/ImageJ. Los resultados se expresaron como promedio $\pm$ desviación estándar de tres réplicas independientes.

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguida del test de Dunnett, considerando diferencias significativas con $p < 0.05$.

Los parámetros de viabilidad y morfología permitieron estimar la concentración letal media (LC₅₀) y la concentración de efecto teratogénico medio (EC₅₀), que se emplearon para calcular el índice terapéutico embrionario (TIE = LC₅₀/EC₅₀) de cada compuesto, indicador de su margen de seguridad en el desarrollo temprano.

2.10. Ensayos de mutagenicidad (Ames Test) [29]

Se utilizó Salmonella typhimurium TA98 (hisD3052) para detectar mutaciones por desplazamiento del marco de lectura, en presencia y ausencia de activación metabólica (fracción S9). Se prepararon cinco diluciones seriadas en DMSO desde la máxima concentración no citotóxica. Los compuestos se incubaron en agar con histidina/biotina por 1 h a 37 °C, luego se sembraron en agar mínimo glucosado y se incubaron por 48 h. Se consideró mutagénico un compuesto cuando el número de revertientes duplicaba al control negativo en al menos dos concentraciones consecutivas.

2.11. Análisis estadístico

Los datos se procesaron mediante OriginPro 9 y GraphPad Prism 5. Las curvas de porcentaje de inhibición vs logaritmo de la concentración se ajustaron mediante regresión no lineal sigmoidea. Para comparar parasitemia y niveles de anticuerpos se empleó ANOVA de una vía con pruebas post hoc no paramétricas. Las curvas de supervivencia se analizaron mediante log-rank (Mantel–Cox). Los resultados se expresaron como media $\pm$ desviación estándar y se consideraron significativos valores de $p < 0.05$.

Resultados, análisis y discusión

Resultados, análisis y discusión

Durante el estudio se evaluaron 105 medicamentos aprobados en Uruguay (Ver Tabla A1), incluyendo 28 que no habían sido previamente ensayados frente a *Trypanosoma cruzi* y 105 de los cuales 83 no habían sido testeados frente a *Leishmania infantum*. El tamizaje fenotípico in vitro permitió identificar un conjunto de compuestos con actividad significativa frente a ambos tripanosomátidos, confirmando la utilidad del reposicionamiento como estrategia racional y de bajo costo para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos en enfermedades desatendidas.

Ensayos in vitro y selección de compuestos

Resultados en *T. cruzi*

En *T. cruzi*, el 18 % de los compuestos ensayados mostró inhibición superior al 65 % del crecimiento de epimastigotes ensayados a 25 μ M, clasificándose como promisorios para futuros estudios. Entre ellos, naftazona (Naft) y pinaverio bromuro (Pinav) presentaron las mejores actividades y los índices de selectividad más altos frente a macrófagos, destacándose como nuevos quimiotipos antichagásicos. Loratadina (Lorat), gabapentina (Gaba) y amlodipina (Amlod) también demostraron actividad relevante, aunque con menor selectividad.

A partir de estos resultados se seleccionaron 13 compuestos para estudios de combinaciones binarias mediante análisis isobolográfico. Se observaron efectos sinérgicos en el 4 % de las combinaciones, aditivos en el 8 % y antagonistas en la mayoría restante, lo que permitió discriminar asociaciones con potencial terapéutico. Las combinaciones loratadina + terbinafina, lapatinib + extracto de trébol rojo (Climodin®) y naftazona + gabapentina fueron sinérgicas o aditivas frente al parásito y antagónicas en macrófagos, lo que constituye un perfil favorable para estudios in vivo.

Ensayos in vivo en modelos murinos de la fase aguda de la enfermedad de Chagas

Para la evaluación preclínica, se seleccionaron cinco fármacos reposicionados (Naft, Gaba, Pinav, Lapatinib y Climodin®) y cuatro combinaciones binarias (Naft+Gaba, Naft+Clim, Lapatinib+Clim y Loratadina+Terbinafina). Los tratamientos se administraron por vía oral durante 15 días consecutivos en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* (cepa CL Brener, DTU TcVI), y se monitorizó la parasitemia, supervivencia y niveles de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*.

Entre las monoterapias, gabapentina y naftazona mostraron reducciones significativas en parasitemia respecto al control PBS, desplazando el primer pico parasitario una semana y disminuyendo la carga total del parásito. Ambas alcanzaron tasas de supervivencia del 80 %, con reducción significativa en títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi* (54 % para Gaba y 76 % para Naft). Climodin® también redujo la parasitemia y mostró una supervivencia del 60 %.

La combinación Naftazona + Gabapentina produjo los mejores resultados globales: redujo la parasitemia en un 73 %, abolió completamente el segundo pico parasitario y alcanzó 100 % de supervivencia al finalizar el tratamiento. Además, disminuyó los títulos de anticuerpos en un 73 % respecto al control, reflejando una fuerte correlación entre control parasitológico y respuesta inmune.

Por su parte, la combinación Naftazona + Climodin® logró la mayor disminución de anticuerpos (87 %), aunque con una supervivencia algo inferior (80 %). Los compuestos Lapatinib + Climodin® y Loratadina + Terbinafina mostraron comportamientos aditivos, con reducción moderada de la parasitemia y buena tolerancia.

Ninguna de las combinaciones o monoterapias evaluadas presentó efectos mutagénicos en el ensayo de Ames, tanto con como sin activación metabólica, lo que confirma su perfil de seguridad inicial.

Caracterización de compuestos sintéticos y estudios de combinaciones

Se logró caracterizar, purificar y obtener el compuesto C1 a escala (Ver Anexo Figura A1) en rendimientos moderados, tal como se confirmó mediante los distintos espectros analíticos.

Además, se analizaron y estudiaron un total de 78 combinaciones frente a las formas no infectivas de *T. cruzi* y *L. infantum* (39 en cada parásito, respectivamente) entre las distintas moléculas sintéticas (C1, C2 y C3, ver anexo Figura A1) y los fármacos comerciales seleccionados.

Se obtuvieron tres combinaciones sinérgicas y una aditiva para *L. infantum*, de las cuales fueron selectivas únicamente dos de las tres sinérgicas. Asimismo, la combinación sinérgica entre el compuesto C2 y el fármaco Amlodipina resultó no mutagénica a concentraciones iguales o menores a la dosis máxima no tóxica (400 μ g/placa).

Por otro lado, se obtuvo una combinación aditiva (C1 + Climodin) para *T. cruzi*, con un IC₅₀ de 0.02 μ M para C1 (400 veces más activo que el fármaco de referencia nifurtimox) y 11.2 μ M para el fármaco comercial, mientras que el índice de selectividad (IS) para C1 en combinación aumentó casi el doble respecto a su monoterapia. En los ensayos de toxicidad embrionaria, la combinación mostró un LD₅₀ al menos 625 veces mayor que su IC₅₀, indicando un margen terapéutico amplio.

A partir de estos resultados, y considerando los estudios ADME previos para C1, se realizaron ensayos in vivo frente a la enfermedad de Chagas (EC), obteniéndose resultados altamente promisorios: la combinación C1 + RF14 alcanzó 100 % de supervivencia, comparable al benznidazol, y una reducción del 55 % en el pico de parasitemia.

Como perspectiva, se propone profundizar los estudios farmacocinéticos de esta combinación para optimizar las dosis efectivas en el modelo murino agudo-crónico de la EC. En conjunto, estos hallazgos confirman que el reposicionamiento y la combinación de nuevos compuestos sintéticos con fármacos existentes mejora su perfil farmacológico y de seguridad, posibilitando el desarrollo de terapias más económicas, seguras y accesibles para enfermedades desatendidas.

Mecanismos de acción en *T. cruzi*

Los estudios complementarios confirmaron que los mecanismos de acción conocidos en mamíferos para Naft, Gaba y Pinav se conservan en el parásito:

Bloqueo de canales de Calcio, que altera la señalización intracelular y la motilidad flagelar del parásito.

Modulación de la homeostasis del glutamato, interfiriendo con el metabolismo energético.

Alteración de la integridad de membranas, que comprometen la replicación y supervivencia del parásito.

En conjunto, estos mecanismos generan un efecto sinérgico sobre la viabilidad de *T. cruzi*, justificando la eficacia observada in vivo.

Resultados en *Leishmania* spp.

La misma colección de fármacos fue evaluada frente a *Leishmania infantum* y *L. braziliensis*. Se identificaron 15 compuestos con actividad significativa, de los cuales varios (naftazona, pinaverio bromuro, formononetina (aislada del extracto de trébol rojo)) coincidieron con los activos frente a *T. cruzi*, lo que sugiere dianas y rutas metabólicas compartidas.

Otros, como profenamina, amlodipina y carvedilol, no compartieron la misma actividad in vitro respecto a *T. cruzi*, siendo activos solo frente a las formas promastigote y amastigote en los modelos de THP-1.

En el modelo in vivo de leishmaniasis cutánea murina, naftazona y amlodipina redujeron la carga parasitaria en las lesiones con eficacia comparable a Glucantime®, incluso a dosis dos a cuatro veces menores. Formononetina y Climodin® presentaron efectos equivalentes entre sí, observándose una reducción marcada de la carga parasitaria con la formononetina, confirmando que la actividad leishmanicida del extracto se debe principalmente a su componente flavónico activo.

Los mecanismos de acción postulados para estos compuestos en *Leishmania* spp. incluyen:

Interferencia con la homeostasis del calcio, análoga a la observada en *T. cruzi*.

Disrupción del potencial mitocondrial y del metabolismo redox, generando estrés oxidativo y apoptosis/necrosis tardía.

Alteración de la integridad de membranas, que comprometen la replicación y supervivencia del parásito, análoga a la observada en *T. cruzi*.

Estos resultados confirman la existencia de blancos moleculares conservados entre *T. cruzi* y *Leishmania* spp., posicionando a estos compuestos como candidatos promotores de amplio espectro dentro de la familia Trypanosomatidae.

Impactos potenciales

Económicos:

El reposicionamiento de medicamentos aprobados representa una estrategia de bajo costo y rápida transferencia tecnológica respecto al desarrollo de nuevas entidades químicas. Dado que los compuestos seleccionados ya poseen información clínica y de seguridad, su transición a estudios preclínicos y clínicos específicos para la enfermedad de Chagas implica una reducción estimada de hasta 60–70 % en costos de desarrollo. Esto es particularmente relevante para enfermedades desatendidas, donde el retorno económico tradicional limita la inversión de la industria farmacéutica.

Sociales:

El acceso a terapias eficaces, seguras y asequibles constituye un beneficio directo para las comunidades vulnerables afectadas por *T. cruzi*. El uso de fármacos de bajo costo y disponibilidad local (como gabapentina o pinaverio bromuro) favorece la equidad en salud y el fortalecimiento de las capacidades farmacéuticas nacionales y regionales. Además, la reducción de la carga parasitaria y de la mortalidad en modelos animales sugiere un impacto potencial positivo en la calidad de vida de los pacientes crónicos, especialmente aquellos con compromiso cardíaco o digestivo.

Ambientales:

El empleo de medicamentos ya aprobados reduce la necesidad de síntesis a gran escala de nuevos compuestos químicos y de los procesos asociados de validación toxicológica, contribuyendo así a un menor impacto ambiental del desarrollo farmacéutico. Adicionalmente, la racionalización del uso de animales de laboratorio en fases tempranas se alinea con los principios de las “3 R” (reducir, reemplazar y refinar).

Conclusiones y recomendaciones

Los resultados obtenidos en los diferentes modelos experimentales evidencian el potencial del reposicionamiento de fármacos clínicamente aprobados como una estrategia eficiente y de bajo costo para el descubrimiento de nuevos agentes activos frente a tripanosomátidos del género *Trypanosoma* spp. y *Leishmania* spp.

En los ensayos in vitro frente a *Trypanosoma cruzi*, varios compuestos (entre ellos naftazona, el extracto del trébol rojo Climodin, bromuro de pinaverio y gabapentina) demostraron una alta capacidad inhibitoria del crecimiento parasitario con bajos niveles de citotoxicidad en células de mamíferos, lo que permitió establecer índices de selectividad superiores a los fármacos de referencia. Estos resultados se correlacionaron con los ensayos in vivo en el modelo murino agudo de la enfermedad de Chagas, donde se observó una reducción significativa de la parasitemia y una mejora en la supervivencia de los animales tratados, validando la eficacia biológica de las moléculas seleccionadas.

En el caso de *Leishmania* spp., las pruebas in vitro en promastigotes y amastigotes de *L. infantum*, junto con el modelo murino cutáneo de *L. amazonensis*, confirmaron la actividad leishmanicida de los mismos compuestos, con efectos comparables o superiores a los fármacos de referencia, como miltefosina y glucantime para la profenamina, proclorperazina, carvedilol, clomipramina y desloratadina.

Las evaluaciones in vivo en el modelo murino de *Leishmania amazonensis* (leishmaniasis cutánea) confirmaron que varias de estas moléculas presentan actividad leishmanicida comparable o superior a la de los fármacos de referencia (miltefosina y glucantime).

Entre los compuestos evaluados, Naftazona, Formononetina, Profenamina, Pinaverio bromuro y Metamizol redujeron significativamente la carga parasitaria en el sitio de lesión y el tamaño de las lesiones cutáneas. Destacaron Naftazona y Amlodipina, que alcanzaron una eficacia equivalente a Glucantime®, pero a dosis 4 y 2 veces menores, respectivamente. Asimismo, Formononetina, en su formulación purificada a partir de Climodin®, demostró una alta eficacia con menor dosis administrada, confirmando la relación entre estructura flavonoide y actividad antiparasitaria.

El análisis estructural y funcional de las moléculas reveló mecanismos de acción convergentes, que incluyen:

Bloqueo de canales de calcio, que afecta la motilidad flagelar y la diferenciación parasitaria.

Alteración de la integridad de membranas, que comprometen la replicación y supervivencia del parásito.

Alteración de la homeostasis del glutamato y del metabolismo energético mitocondrial.

El ensayo de toxicidad embrionaria en *Danio rerio* proporcionó un sistema predictivo altamente sensible para la evaluación de seguridad preclínica. La combinación más activa (C1 + RF14, derivada de Climodin) mostró efectos letales sólo a concentraciones muy superiores a las terapéuticamente efectivas, confirmando un amplio margen de seguridad y una baja teratogenicidad en etapas tempranas del desarrollo, esto fue estudiado en el marco de la tesina de grado en Bioquímica de la Lic. Pilar Terra.

De manera general, la integración de los resultados in vitro, in vivo y en modelos alternativos sugiere que los compuestos evaluados actúan sobre blancos moleculares conservados en tripanosomátidos, presentando sinergia entre mecanismos de acción y una toxicidad aceptable en organismos superiores, lo que los posiciona como candidatos prometedores para avanzar a etapas preclínicas avanzadas.

Recomendaciones

Avanzar hacia estudios preclínicos ampliados, incluyendo farmacocinética y biodistribución en modelos murinos crónicos, para definir perfiles de exposición y concentración terapéutica.

Profundizar en los estudios mecanísticos, utilizando herramientas de biología molecular, proteómica y metabolómica, para confirmar los blancos celulares implicados (canales iónicos, enzimas redox, metabolismo del calcio y del glutamato).

Evaluar la eficacia combinada de las moléculas más activas (por ejemplo, Naftazona + Profenamina o C1 + RF14) frente a cepas resistentes de *T. cruzi* y *Leishmania*, buscando efectos sinérgicos y reducción de dosis efectivas.

Incorporar modelos animales alternativos, como el pez *Danio rerio* y el modelo de infección en *Galleria mellonella*, para reducir el uso de vertebrados y optimizar la detección temprana de toxicidad.

Considerar los impactos socioeconómicos y ambientales del desarrollo de estas formulaciones:

Su producción se basa en fármacos ya disponibles y de bajo costo, lo que facilita su implementación en países endémicos con recursos limitados.

El reposicionamiento reduce drásticamente los tiempos y costos regulatorios respecto a nuevos desarrollos químicos.

Desde el punto de vista ambiental, la síntesis o recuperación de principios activos a partir de fuentes vegetales o naturales (como extractos de lúpulo o derivados de flavonoides) ofrece alternativas sostenibles y con menor impacto ecológico.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la viabilidad de continuar esta línea de investigación interdisciplinaria en química medicinal, parasitología y farmacología, promoviendo el desarrollo de nuevas terapias seguras, accesibles y ambientalmente responsables contra las enfermedades de Chagas y Leishmaniasis.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Artículo científico	Looking for approved-medicines to be repositioned as anti-Trypanosoma cruzi agents. Identification of new chemotypes with good individual- or in combination-biological behaviours	Claudia Veira, Diego Benítez, Leticia Pérez-Díaz, Guzmán Álvarez, Hugo Cerecetto, Elena Aguilera		https://hdl.handle.net/20.500.12008/53058	Finalizado
Artículo científico	Drug repurposing for Chagas disease: Trying to overcome the 1 hit-to-preclinical candidate stage	Claudia Veira,a Belén Dávila, Elva Serna, Nilda Portillo, Gloria Yaluff,b Guzmán Álvarez, Hugo Cerecetto, Elena Aguilera		https://hdl.handle.net/20.500.12008/53063	Finalizado
Artículo científico	A new drug candidate for treating leishmaniasis was discovered using a drug repurposing approach.	Rachel Ramos, Santiago Chavez, Maria Ana Duaghon, Elva Serna, Gloria Yaluff, Marcelo A. Comini, Diego Benites, Elena Aguilera, Guzmán Álvarez			En proceso
Tesis de grado/monografías	Polifarmacología y reposicionamiento como estrategia frente a enfermedades parasitarias desatendidas	Pilar Terra, Paola Lepanto y Elena Aguilera		https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/50397/1/uy24-21690.pdf	Finalizado
Tesis de maestría	REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIASIS	Rachel Ramos, Guzmán Álvarez,			En proceso

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
	VISCERAL	Elena Aguilera			
Tesis de maestría	Reposicionamiento de fármacos para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas	Claudia Veira, Hugo Cerecetto, Elena Aguilera			En proceso
Póster	Esperanza en la búsqueda de tratamiento para la leishmaniasis visceral	Rachel Ramos Granja , D. BENÍTEZ , COMINI MA , Guzmán Alvarez , Aguilera, E.		https://hdl.handle.net/20.500.12008/53062	Finalizado
Póster	Polifarmacología como estrategia frente a la leishmaniasis visceral.	Pilar Terra , Veira, M.C. , Ramos,R. , CERECETTO, H. , Guzmán Alvarez , Aguilera, E.		https://hdl.handle.net/20.500.12008/53064	Finalizado
Póster	Búsqueda de agentes anti- T. cruzi utilizando estrategias de reposicionamiento y polifarmacología.	Veira, M.C. , Aguilera, E. , CERECETTO, H.		https://hdl.handle.net/20.500.12008/53061	Finalizado
Presentación en evento	NUEVAS MOLÉCULAS CON ACCIÓN LEISHMANICIDA: REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS COMO ESTRATEGIA PARA EL TRATAMIENTO EFECTIVO DE LA LEISHMANIASIS VISCERAL	Ramos Granja, R , D. BENÍTEZ , COMINI MA , Guzmán Alvarez , Aguilera, E		https://sites.google.com/view/juquimed/programa/programa	Finalizado
Presentación en evento	EFFECTO DE COMBINACIONES ENTRE MOLÉCULAS SINTÉTICAS Y FÁRMACOS COMERCIALES SOBRE PARÁSITOS TRIPANOSOMÁTIDOS	Pilar Terra, Claudia Veira, Rachel Ramos, Guzmán Álvarez, Hugo Cerecetto, Paola Lepanto, Elena Aguilera		https://sites.google.com/view/juquimed/programa/programa	Finalizado

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Presentación en evento	Reposicionamiento de fármacos para el tratamiento de la enfermedad de chagas. Identificación de nuevos quimiotipos con respuesta biológica frente a trypanosoma cruzi en monoterapia o en combinación	Claudia Veira, Diego Benítez, Leticia Pérez-Díaz, Guzmán Alvarez, Hugo Cerecetto, Elena Aguilera		https://sites.google.com/view/juquimed/programa/programa	Finalizado
Póster	Novel potential drug scaffold against visceral Leishmaniasis discovered using a drug repurposing approach	Rachel Ramos, Guzmán Álvarez, Marcos Couto, Marcelo A. Comini, Diego Benítez, Elena Aguilera		https://hdl.handle.net/20.500.12008/53057	Finalizado
Póster	¿Es posible reposicionar principios activos disponibles en Uruguay en patologías humanas para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas en animales domésticos?	Claudia Veira, Hugo Cerecetto y Elena Aguilera		https://hdl.handle.net/20.500.12008/53059	Finalizado

Referencias bibliográficas

[1] Beltrán-Hortelano I, Brennan F, Sanz-Ros A, Pándy-Szekeres G, Cordon-Obras C, Rojas-Barros DI, et al. Examination of multiple Trypanosoma cruzi targets in a new drug discovery approach for Chagas disease. *Bioorg Med Chem.* 2022;58:116577.

[2] Requena-Méndez A, Aldasoro E, de Lazzari E, Sicuri E, Brown M, Moore DAJ, et al. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(2):e0003540.

[3] World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340. Geneva: WHO; 2015. Disponible en: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Consultado el 2 abril 2025.

[4] Osimani JJ. Parasitología médica. Tomo I. Montevideo: Librería Médica Editorial; 1982. p.95.

[5] World Health Organization. [Título del informe sobre la enfermedad de Chagas]. Geneva: WHO; 2010.

[6] Pedrosa CM. Clinical manifestations of visceral leishmaniasis (American visceral leishmaniasis). In: [Rangel EF, Shaw JJ], editors. *The epidemiology and ecology of leishmaniasis*. London: IntechOpen; 2017. p.[páginas].

[7] Ministerio de Salud Pública; Comisión Nacional Honoraria de Zoonosis; Universidad de la República; Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (Uruguay). Guía de diagnóstico, tratamiento y control de la leishmaniasis visceral en Uruguay: un enfoque desde "Una Salud". Montevideo: MSP; 2019. Disponible en: <https://www.gub.uy/sistema-nacional-emergencias/sites/sistema-nacional-emergencias/files/2019-07/Guia%20de%20diagnostico%20tratamiento%20y%20control%20de%20la%20leishmaniasis%20visceral%20en%20Uruguay.pdf>

[8] Borba M, Castro S, Mojoli M, Rodríguez A. Situación actual de la leishmaniasis en el Uruguay. *Salud Militar.* 2020;39(1):3–10. <https://doi.org/10.35954/sm2020.39.1.3>

[9] Ministerio de Salud Pública (Uruguay). Control de la leishmaniasis canina mediante el uso de collares con deltametrina al 4 %. *Bella Unión. Informe*, noviembre 2024. Montevideo: MSP; 2024. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/publicaciones/control-leishmaniasis-canina-mediante-uso-collares-deltametrina-4-bella> (último acceso 13/11/2025).

[10] Organización Panamericana de la Salud. [Título del informe]. Washington (DC): OPS; 2022.

[11] Nagle AS, Khare S, Kumar AB, Supek F, Buchynskyy A, Mathison CJN, et al. Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African

trypanosomiasis. *Chem Rev.* 2014;114(22):11305–47.

Frontiers

[12] Mosajab E, Ramazani A, Taran M, Hajjarian H, Mohebbi M, Rezaei S, et al. Epidemiological aspects of cutaneous leishmaniasis during 2013–2018 in Iran. *J Parasit Dis.* 2021;45(3):677–83.

[13] Paliwal S, Gahtori P, Kumar A, Verma A. Drug resistance and repurposing of existing drugs in leishmaniasis. In: Rani V, Kesari A, editors. *Drug repurposing in infectious diseases*. Singapore: Springer; 2021. p.175–204.

[14] da Silva Bortoleti B, Gonçalves MD, Tomiotto-Pellissier F, Carloto ACM, Detoni MB, Assolini JP, et al. Nanomedicine in leishmaniasis: a promising tool for diagnosis, treatment and prevention. *Eur J Pharmacol.* 2022;915:174934.

Organización Mundial de la Salud

[15] Piccica M, Pagliai L, Spinicci M, Mantella A, Pavoni V, Chiappino D, et al. Imported leishmaniasis in high-income countries: a 15-year retrospective study at a referral center in Florence, Italy. *Infection.* 2021;49(3):533–42.

[16] Daher EF, Evangelista LF, Silva Júnior GB, Bezerra GP, Rocha NA, Lima RS, et al. Clinical and epidemiological features of visceral leishmaniasis in adults in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009;51(4):211–6.

liabjournal.com

[17] Diro E, Lynen L, Ritmeijer K, Boelaert M, Hailu A, van Griensven J. Visceral leishmaniasis and HIV co-infection in East Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(6):e2869.

liabjournal.com

[18] Michel G, Pomares C, Ferrua B, Marty P. Human visceral leishmaniasis: approaches to treatment and drug resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(5):563–77.

[19] Cabrera N. [Título del libro o capítulo]. [Lugar de publicación]: [Editorial]; 2009.

[20] Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(8):673–83.

[21] Chatelain E, Ioset JR. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:1759–65.

[22] Ponte-Sucre A, Díaz E, Padrón-Nieves M. Drug resistance in Leishmania parasites. In: Ponte-Sucre A, Díaz E, Padrón-Nieves M, editors. *Drug resistance in Leishmania parasites*. Cham: Springer; 2017. p.[páginas].

[23] Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):111–26.

[24] World Health Organization. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2019: a comprehensive assessment. *Wkly Epidemiol Rec.* 2021;96(35):401–19.

[25] Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(1):41–58.

[26] Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(8):673–83.

[27] Nosengo N. New tricks for old drugs. *Nature.* 2016;534(7607):314–6.

[28] Aguilera E, Varela J, Birriel E, Serna E, Torres S, Yaluff G, et al. Potent and selective inhibitors of Trypanosoma cruzi triosephosphate isomerase with concomitant inhibition of cruzipain: inhibition of parasite growth through multitarget activity. *ChemMedChem.* 2016;11(12):1328–38. doi:10.1002/cmdc.201500385.

[29] Benítez D, Medeiros A, Quiroga C, Comini MA. A simple bioluminescent assay for Trypanosoma cruzi epimastigote and intracellular amastigote screening. *Methods Mol Biol.* 2022;2524:127–47.

[30] Álvarez G, Perdomo C, Coronel C, Aguilera E, Varela J, Aparicio G, et al. Multi-anti-parasitic activity of arylidene ketones and thiazolidene hydrazines against Trypanosoma cruzi and Leishmania spp. *Molecules.* 2017;22(5):709.

[31] Aguilera E, Varela J, Serna E, Torres S, Yaluff G, Vera de Bilbao NV, et al. Looking for a combination of benzimidazole and Trypanosoma cruzi triosephosphate isomerase inhibitors for Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018;113(3):153–60.

[32] Aguilera E, Álvarez G, Cerecetto H, González M. Polypharmacology in the treatment of Chagas disease. *Curr Med Chem.* 2018;25(30):4476–89.

[33] Aguilera E, Perdomo C, Espíndola A, Corvo I, Faral-Tello P, Robello C, et al. A nature-inspired design yields a new class of steroids against trypanosomatids. *Molecules.* 2019;24(21):3800.

[34] Álvarez G, Martínez J, Varela J, Birriel E, Cruces E, Gabay M, et al. Development of bis-thiazoles as inhibitors of triosephosphate isomerase from Trypanosoma cruzi: identification of new non-mutagenic agents that are active in vivo. *Eur J Med Chem.* 2015;100:246–56.

[35] Álvarez G, Varela J, Cruces E, Fernández M, Gabay M, Leal SM, et al. Identification of a new amide-containing thiazole as a drug candidate for treatment of Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(4):2037–47.

[36] Álvarez G, Martínez J, Varela J, Birriel E, Cruces E, Gabay M, et al. Development of bis-thiazoles as Trypanosoma cruzi triosephosphate isomerase inhibitors: identification of new non-mutagenic in vivo active agents. *Eur J Med Chem.* 2015;100:246–56.

[37] Veira C, Benítez D, Pérez-Díaz L, Álvarez G, Cerecetto H, Aguilera E. Looking for approved medicines to be repositioned as anti-Trypanosoma cruzi agents: identification of new chemotypes with good individual or in-combination biological behaviours. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2025;120(3):e240183.

PMC

[38] Romero AH, Aguilera E, Gotopo L, Cabrera G, Dávila B, Cerecetto H. The indole motif is essential for the antitrypanosomal activity of novel curcuminoid derivatives. *RSC Med Chem.* 2023;14:1992–2006

Licenciamiento

Reconocimiento 4.0 Internacional. (CC BY)

